SULLA PREPARAZIONE

DEL

SIERO ANTICARBONCHIOSO

(MEMORIA 2ª)

DEL

Dott. ACHILLE SCLAVO

ROMA
TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE
1896

Rispettoso omaggio dell'autore

SULLA PREPARAZIONE

DEL

SIERO ANTICARBONCHIOSO

(MEMORIA 2ª)

DEL

Dott. ACHILLE SCLAVO

ROMA
TIPOGRAFIA DELLE MANTELLATE
1896

SULLA

PREPARAZIONE DEL SIERO ANTICARBONCHIOSO

(MEMORIA 2a)

DEL

Dott. ACHILLE SCLAVO

Dalle numerose ricerche, fatte in questi ultimi anni nel campo della batteriologia, venne fuori il concetto generale che per mezzo del siero di sangue delle specie animali, per natura refrattarie verso gli agenti di certe malattie, non possa essere trasmessa affatto, oppure in grado solo lievissimo, l'immunità a quegli altri animali, in cui la disposizione è più o meno spiccata.

Quando invece venga scelto un animale sensibile ad un dato germe infettivo e lo si sottoponga ad un trattamento, che sebbene vario nelle modalità consiste si può dire sempre nella somministrazione di quantità diverse di quel germe più o meno attivo, ovvero dei prodotti del suo ricambio, all'occorrenza più o meno modificati, insorge di regola con la immunità acquisita una modificazione degli umori di quell'animale. Il siero spiega allora proprietà preventive e curative contro il germe, che fu scelto per il trattamento.

L'efficacia di un tale siero oltrechè dipendere da altri fattori sta pure in un certo rapporto diretto con la sensibilità, che l'animale immunizzato ha mostrato verso l'elemento patogeno.

Queste leggi dimostrate dapprima vere specialmente per due malattie, la difterite e il tetano, eccitarono ben tosto l'attività degli sperimentatori alla ricerca di quelle specie animali, che fossero capaci di fornire un siero in massimo grado efficace, in senso preventivo e curativo, contro le altre malattie infettive.

Anche per il carbonchio erasi sperato dapprima che l'immunità propria ad alcune specie potesse trasmettersi con il sangue di queste agli animali sensibili.

Ogata e Iasuhara (1), in un lavoro comparso il 20 dicembre del 1889 nel giornale della Società medica di Tokio, pubblicarono le loro prime esperienze sull'azione profilattica e curativa contro il carbonchio del sangue di alcuni animali dotati di una spiccata refrattarietà naturale (rana, cane, ratto).

In successive memorie edite nel 1890 essi confermarono lo stesso fatto con indagini più numerose.

Behring (2) parimenti riuscì a salvare i topi dal carbonchio iniettando loro nel peritoneo siero di sangue di ratto.

La virtù preservatrice del siero di ratto contro il carbonchio è stata confermata anche da Hankin (3) e poi ancora da Metchnikoff e da Roux (4); questi tre autori ritengono però che la parte principale nel fenomeno sia dovuta al contatto immediato del siero di ratto, così spiccatamente battericida, con i bacilli del carbonchio, perchè se il siero è iniettato separatamente dai microrganismi, non si riesce più ad impedire l'infezione.

Si tratterebbe dunque in questo caso della trasmissione non di una immunità vera e propria, bensì di una resistenza strettamente locale.

Nella seduta del 23 novembre 1890 della Società di biologia di Parigi, Laborde (5) ricordò che Rondeau, facendo trasfusioni di sangue di cane nei montoni, riuscì in qualche caso a preservarli dal carbonchio.

---

(1) M. OGATA: « Ueber die Immunitätsfrage ». *Deutsche Medicinische Wochenschrift*, 1891, pag. 565.

(2) BEHRING: « Ueber Desinfection, Desinfectionsmittel und Desinfectionsmethoden. » *Zeitschrift für Hygiene*, vol. IX, pag. 473.

(3) HANKIN: « Cures of infectious diseases ». Rivista fatta sul *Centralblatt für Bakteriologie*, vol. 10, pag. 396.

(4) METCHNIKOFF et ROUX: « Sur la propriété bactéricide du sang de rat ». *Annales de l'Istitnte Pasteur*, vol. V, pag. 478.

(5) *Semaine médicale*, 1890, pag. 433.

Ma nessuna qualità profilattica fu riconosciuta invece da altri esperimentatori nel siero degli animali per natura refrattari contro il carbonchio.

Così non ottennero che risultati sfavorevoli Enderlen (1) con il siero di cane; Serafini ed Erriquez (2) con quello di cane, di ratto, di pollo, di rana, di rospo e di ramarro; Petermann (3) con quello di cane e Roudenko (4) con il siero di rana.

Per quanto sconfortanti siano stati questi tentativi, era tuttavia ancora lecito sperare risultati soddisfacenti, quando per combattere l'infezione carbonchiosa si fosse fatto uso del siero delle specie sensibili al carbonchio, ma rese resistenti mediante un conveniente processo di immunizzazione.

All'aspettativa corrisposero i fatti e nella seduta del 22 ottobre del Congresso di medicina interna, tenutosi in Roma nel 1895, io resi noto che con il siero di un montone e di un agnello, solidamente immunizzati, mi era stato possibile prevenire nei conigli l'infezione carbonchiosa e scongiurare anche per essi l'esito letale della malattia iniettando il siero dodici ore dopo la cultura.

Le mie asserzioni ricevettero presto piena conferma da Marchoux il quale, nella seduta del 2 novembre 1895, comunicava alla Società di biologia di Parigi l'esito felice delle sue prove, avuto con il siero del coniglio e della pecora immunizzati contro il carbonchio.

***

Quantunque la pecora immunizzata fornisca un siero manifestamente attivo contro il carbonchio, era da ricercarsi se con altre specie animali fosse dato di preparare un siero di più elevato potere specifico ed ho perciò estese le mie ricerche alla capra, al vitello, all'asino ed al cavallo.

Gli animali da me immunizzati furono in tutto otto, cioè tre pecore, due capre, un vitello, un asino ed un cavallo.

---

(1) ENDERLEN: *Münchener medicinische Wochenschrift*, 1891, pag. 320.

(2) SERAFINI ed ERRIQUEZ: « Sull'azione del sangue di animali immuni inoculato ad animali suscettibili per carbonchio ». *Annali dell'Istituto d'Igiene sperimentale dell'Università di Roma*, vol. 1, 1891, pag. 121.

(3) PETERMANN: *Annales de l'Institut Pasteur*, 1891, pag. 506.

(4) ROUDENKO: *Annales de l'Institut Pasteur*, 1891, pag. 515.

Iniettai a tutti dapprima, tranne che ad una pecora messa a prova subito con una cultura di carbonchio abbastanza virulento, i due vaccini di Pasteur, cui feci seguire ripetute iniezioni di quantità crescenti di culture sempre più virulenti.

Per avere a disposizione una rilevante massa di corpi bacillari seminavo il germe negli ordinari recipienti di Fernbach, in cui mettevo soltanto 100 cmc. di brodo. In quel sottilissimo strato di liquido esposto così ampiamente all' aria era molto abbondante lo sviluppo del microrganismo.

Le iniezioni furono fatte per l'asino, il cavallo ed il vitello sotto cute alla base del collo; per le pecore e le capre invece nel sottocutaneo dell'addome o delle coscie e talora nel peritoneo, quando grande era la dose di cultura.

Foravo in questo caso la pelle con un punteruolo ed iniettavo il liquido nella cavità addominale attraverso ad un ago-cannula a punta tagliata, con cui attraversavo facilmente la parte muscolare senza pericolo di ledere l'intestino (1).

Gli animali sopportarono sempre assai bene queste iniezioni peritoneali.

***

Le culture di carbonchio che possedevo, quando intrapresi le mie esperienze, non erano molto attive, cosicchè tentai esaltarle con passaggi attraverso al corpo degli animali. Feci inoculazioni in serie nei conigli e nei piccioni digiunanti con una cultura, che indicherò d'ora innanzi con la lettera *A* e che inizialmente uccideva alla dose di 1 cmc. (cultura in brodo di 24 ore) i conigli di 1500 grammi in capo a 40-50-55 ore.

Stando ai risultati di Pasteur e di Metchnikoff il piccione risponderebbe assai bene allo scopo di rinforzare il virus carbonchioso, tantochè, secondo Pasteur, il bacillo uscito dal corpo di questa specie animale sarebbe in grado di uccidere direttamente i polli (2).

---

(1) Questa tecnica è stata raccomandata da PFEIFFER per le cavie (*Zeit. f Hygiene*, vol. XIX, pag. 91) e di essa mi servii anche per le esperienze, che più tardi verranno riferite.

(2) METCHNIKOFF: « Etudes sur l'immunité ». *Annales de l'Institut Pasteur*, 1890, pag. 67.

Mi sono servito degli ordinari piccioni del mercato di razza incrociata ed ho preferito l'iniezione endovenosa, adoperando culture in brodo di età non inferiore alle 24 ore ed alla dose di 1 cmc. Sei piccioni furono iniettati e poi messi a digiunare, altri quattro invece ricevettero la cultura a digiuno più o meno inoltrato.

TAVOLA N. 1.

ANIMALE	Peso al momento dell'innesto	Quanto visse dopo l'innesto	Peso alla morte del colombo	*Osservazioni*
Colombo N. 1	gr. 400	5 giorni	gr. 330	
» » 2	» 480	7 »	» 340	
» » 3	» 310	6 »	» 260	Digiunava dal 4 II 96, peso iniziale gr. 360.
» » 4	» 230	3 »	» 190	Digiunava dall'11 II 96, peso iniziale gr. 360.
» » 5	» 320	4 »	» 240	Digiunava dal 18 II 96, peso iniziale gr. 360.
» » 6	» 330	3 »	» 280	Digiunava dal 25 II 96, peso iniziale gr. 350.
» » 7	» 420	6 »	» 340	
» » 8	» 380	7 »	» 225	
» » 9	» 310	2 »	» 270	
» » 10	» 330	4 »	» 280	

Il giorno successivo alla morte dell' ultimo piccione inoculai altri quattro piccioni, di cui i due primi con la cultura ottenuta dal sangue del piccione N. 10 ed i numeri 3 e 4 con un trasporto di eguale età proveniente da quel germe *A*, con cui avevo infettato il piccione N. 1.

I piccioni ricevettero il germe rispettivamente sotto cute e nelle vene e non furono sottoposti a digiuno.

TAVOLA N. 2.

ANIMALE	Peso in grammi	Dove fu inoculato il germe	Quanti giorni sopravvisse l'animale all' iniezione	*Osservazioni*
Piccione N. 1	330	nelle vene	22	Morto di carbonchio.
» » 2	340	sotto cute	38	Morto di marasmo.
» » 3	340	nelle vene	13	Morto di carbonchio.
» » 4	360	sotto cute	24	Morto di marasmo.

Altre prove comparative fatte con sei conigli mi convinsero che anche per questi animali la virulenza del bacillo dell' antrace ricavato dal piccione N. 10 non si era fatta maggiore. Parimente la cultura *A* non mostrò tendenza a diventare molto attiva per il passaggio attraverso al corpo di 14 conigli inoculati successivamente l'uno con il sangue dell'altro appena morto di carbonchio.

Non essendo dunque riuscito a spingere il germe *A* al di là di un certo grado di virulenza, mi decisi a servirmi per le prove di esaltazione di altri due bacilli *B* e *C*, isolati da poco da due campioni di sangue di cavallo e di maiale spediti in esame ai laboratorii del Ministero dell' Interno. Bastarono pochi passaggi attraverso al coniglio, perchè il germe *B*, alla dose di 1 cmc. di cultura in brodo di 24 ore, uccidesse i conigli in 24 ore circa, talora anche in meno di 18 ore.

La cultura *C*, saggiata nelle medesime condizioni sui conigli, li fece morire in un tempo generalmente un po' più lungo, che variò quasi sempre dalle 24 alle 36 ore.

Esistono dunque in natura bacilli del carbonchio, che posseggono un potere patogeno alquanto diverso e che non acquistano in virulenza con eguale facilità per il passaggio attraverso agli organismi animali.

***

Nei tentativi da me fatti sul piccione per aumentare il potere patogeno del bacillo *A*, mi accadde di osservare che alcune culture in agar fatte col sangue di piccione si mostravano dopo alcuni giorni più scure del solito.

Ciò si verificò in grado più spiccato con il sangue del piccione N. 4, tanto che feci altri trasporti in agar per accertarmi se la proprietà cromogena fosse diventata trasmissibile.

Ed infatti così fu. Infettando con quella cultura la superficie dell'agar, obliquamente solidificato in provetta, si vede che in capo a due giorni circa il mezzo nutritivo comincia a farsi nero in alto dove è più sottile la massa dell'agar; l'imbrunimento si estende poi man mano a tutto il contenuto della provetta e si fa così spiccato che l'agar diventi talora decisamente nero.

Non ebbi tempo di insistere nello studio delle condizioni, che più favoriscono la produzione del pigmento da parte del bacillo *A*;

notai solo che il pigmento più rapidamente si forma nell' agar semplice a reazione leggermente alcalina che non in quello addizionato di glicerina o di glucosio al 2 %.

***

Riporto qui sotto il protocollo dove è indicato il trattamento, cui vennero sottoposti gli animali da me immunizzati contro il carbonchio.

L' iniezione dei due vaccini Pasteur non produsse in nessuno disturbi di sorta, tranne un po' di reazione locale specialmente nelle capre.

Se qualche volta in seguito a forti quantità di virus si accese la febbre, questa non durò mai a lungo.

I fenomeni locali al punto di innesto furono talora imponentissimi, ma nelle pecore, nelle capre e nel vitello andarono man mano dileguandosi, mentre nell' asino e nel cavallo si produssero alle ultime iniezioni ascessi più o meno estesi, nei quali fu sempre riscontrato in cultura pura il bacillo carbonchioso.

Dunque per questi due animali diventati refrettari, ma specialmente per l'asino, il bacillo del carbonchio perdette le sue proprietà setticoemiche e si trasformò in uno squisito germe piogene.

PROTOCOLLO.

Asino di razza sarda, peso kgr. 121.

8 III 96. Inietto il 1° vaccino. Scarsa reazione locale.
10 III Inietto il 2° vaccino. Nessuna reazione locale.
14 IV Ore 17, inietto 1,5 cmc. di cultura in brodo di 24 ore di carbonchio *A*.
15 IV Notevole tumefazione, temperatura normale.
26 IV Ore 16,45, temperatura 37,3.
Ore 17. Quattro cmc. di cultura in brodo di 24 ore di carbonchio *B*.
27 IV Ore 8, temperatura 38,1. Vasto edema.
» 12 » 38,3
» 17 » 37,7
28 IV » 8 » 37,2.

5 V 96. Iniettò 5 cmc. di coltura in brodo di 24 ore di carbonchio *B*. Scarsa reazione locale in cui sospendo tre culture su agar in provette dello stesso bacillo. Prima dell' iniezione la temperatura era di 37,1.

Ore 19, temperatura 37,5

20 V Ore 15, quindici cmc. di cultura in brodo di 24 ore di carbonchio *B*.

21 V » 8 » 38,6
» 12 » 38,8
» 19 » 38,7.

22 V Temperatura normale.

9 VI Ore 9, quaranta cmc. di cultura in brodo di 24 ore di carbonchio *B*, in cui sospendo tre colture su agar in provetta dello stesso germe.

La temperatura prima dell'iniezione era di 37,4.

Ore 12, temperatura 37,6
» 18 » 38,7

10 VI » 7 » 38,1
» 12 » 38,3
» 18 » 38,3.

C'è al luogo d'innesto tumefazione estesissima, dura, dolente alla pressione.

11 VI Temperatura normale.

16 VI La tumefazione si è ridotta e si formò un ascesso grosso quanto un arancio. All'apertura di esso esce pus giallo fluido.

All'esame microscopico trovo bene conservati i corpuscoli purulenti, ma non vedo bacilli. Nelle culture compaiono soltanto colonie di carbonchio.

1 VII Salasso dalla giugulare.

9 VII Ore 10, centocinquanta cmc. di cultura in brodo, di carbonchio *B*. L' iniezione fu fatta al collo in due punti distinti. Prima dell'iniezione temperatura di 37,6.

Ore 17, temperatura 39,9
» 19 » 39,7
» 24 » 38,5.

Edema estesissimo che si diffonde all'arto anteriore.

10 VII Ore 8, temperatura 37,9
» 12 » 38,3
» 19 » 38,5

11 VII » 8 » 37,8
» 12 » 37,6
» 19 » 38,2.

12 VII Temperatura normale.

14 VII Si sono formati due piccoli ascessi in corrispondenza dei luoghi d'innesto.

24 VII Salasso dalla giugulare.

Cavallo baio, peso kgr. 380.

21 IV 96. Inietto il 1° vaccino Pasteur. Scarso edema locale.
3 V Inietto il 2° vaccino Pasteur.
13 V Due cmc. del 2° vaccino.
23 V Inietto un cmc. di cultura in brodo, di carbonchio *A*.
3 VI Inietto un cmc. di cultura in brodo di carbonchio *B*.
13 VI Ore 9. Inietto 5 cmc. di cultura in brodo di carbonchio *B*, in cui ho sospeso una cultura in agar dello stesso bacillo.
Nel pomeriggio c'è al luogo d'innesto una tumefazione del diametro di 20 cm. circa e la temp. alle ore 17 è di 38,2.
14 VI Temperatura normale, edema in parte scomparso.
28 VI Ore 10. Inietto 75 cmc. di cultura in brodo di carbonchio *B*.
Notevole edema. La temperatura raggiunge 38,5 alle 9 del giorno dopo e poi ridiscende.
12 VII Ore 15. Inietto 150 cmc. di cultura in brodo di carbonchio *B*.
Ore 14,30, temperatura 37,8
» 19 » 38
» 21 » 39,8
15 VII » 8 » 39,1
» 12 » 38,8
» 19 » 38
16 VII Il cavallo presenta una estesissima tumefazione attorno al punto d' innesto, dura e molto dolente alla pressione. In capo ad una settimana la tumefazione è quasi del tutto scomparsa.
25 VII Salasso dalla giugulare.
10 VIII Ore 17. Inietto 200 cmc. di cultura in brodo di carbonchio *B*.
Ore 16,30, temperatura 37,6
» 22 » 37,7
11 VIII » 8 » 38
» 12 » 38,9
» 19 » 38.
12 VIII L'animale presenta vastissimo edema, che decresce mano mano.
22 VII Il tumore è ridotto della metà circa. Il pus che ottengo da esso è giallo e fluido; all'esame microscopico non vedo in esso bacilli del carbonchio. L'agar infettato con il pus dà luogo allo sviluppo del germe in cultura pura.

Vitello, peso kgr. 170.

3 III 96. 1° vaccino.
15 III 2° vaccino.
14 IV 1 cmc. di cultura in brodo di carbonchio *A*. Poca reazione locale.

26 IV 96. Inietto 4 cmc. di cultura in brodo di carbonchio *B.*
27 IV Discreta reazione locale.
5 V 5 cmc. di cultura in brodo di carbonchio *B.*
20 V Ore 15. Una cultura in provetta su agar e 10 cmc. di cultura in brodo di bacillo *B.* Prima dell'iniezione la temperatura era di 38,7.
Ore 19, temperatura 39
21 V » 8 » 39,4
» 12 » 39,6
» 19 » 39,6
22 V » 8 » 38,6
9 VI » 9 » 38,6. Inietto tre culture ben sporificate su agar in provetta e 40 cmc. di cultura in brodo di carbonchio *B.*
Ore 12, temperatura 39,2
» 18 » 40,2
10 VI Ore 7, temperatura 39,5
» 12 » 39,5
» 18 » 39,8
11 VI » 7 » 39,3
» 12 » 39,3
» 18 » 39,2.
12 VI Temperatura normale.
20 VI Salasso dalla giugulare.
28 VI Ore 10, temperatura 38,6. Inietto 125 cmc. di cultura in brodo di carbonchio *B.*
Ore 12, temperatura 39.
» 19 » 40,2.
Estesissimo edema al luogo d'innesto, duro e dolente: l'animale è abbattuto e non mangia.
29 VI Ore 8, temperatura 40,1
» 12 » 39,6
» 19 » 40,2
30 VI » 8 » 40,1
» 12 » 40,3
» 19 » 39,5
1 VII » 8 » 39,6
» 12 » 39,6
» 19 » 39,7
2 VII » 8 » 39,6
» 12 » 39,6
» 19 » 39,3.
3 VII L'animale va dimagrando e solo verso il 10 mangia con l'appetito di prima.
21 VII Salasso dalla giugulare.

Montone, peso kgr. 19.

22 III 95. 1° vaccino, poca reazione.
4 IV 2° vaccino.
27 IV 1/2 cmc. di 2° vaccino.
16 V 1 cmc. di 2° vaccino.
27 V 1 cmc. di cultura di carbonchio in brodo di bacillo *A*.
12 VI 5 cmc. della cultura precedente.
18 VI 8 cmc. della cultura precedente.
6 VII 15 cmc. della cultura precedente.
21 VII 20 cmc. della cultura precedente.
17 VIII 3 culture su agar in provette di bacillo *A*.
12 IX 7 culture su agar in provette di bacillo *A*.
18 IX Salasso dalla carotide.
5 X 7 culture in provette su agar di carbonchio *A*.
24 X 10 culture in capsule di Petri su agar di carbonchio *A*. Spiccata reazione locale che scomparve in capo a 10 giorni.
5 XII 25 cmc. di cultura in brodo di carbonchio *A*.
9 I 96. 70 cmc. di cultura in brodo di carbonchio *A*.
10 II 10 culture di carbonchio *A* su agar in provette.
26 II Salasso dalla giugulare.
22 III Ore 11, 150 cmc. di cultura in brodo di carbonchio *A* nel peritoneo. La temperatura che prima dell'iniezione alle ore 11 era di 38,8, salì a 39,9 alle ore 19 e il giorno dopo tornò alla normale.
16 IV 300 cmc. di cultura in brodo di carbonchio *A* nel peritoneo.
23 IV Ore 18, temperatura 38,9. Inietto sottocute tutto il sangue che ho potuto raccogliere dal cuore di 3 conigli morti da poco di carbonchio *B*.
24 IV Ore 7, temperatura 40,1 Enorme reazione locale.
» 14 » 40
» 19 » 39,3
25 IV » 9 » 39,6
» 12 » 39,2
» 19 » 39.
6 V Salasso dalla giugulare.

Pecora N. 1, peso kgr. 17.

6 VI 95. Inoculo alla coscia 2 cmc. di cultura in brodo di carbonchio *A*, allo scopo di uccidere l'agnella. Viva reazione locale con ingorgo delle ghiandole inguinali. Questa stessa cultura iniettata alcuni mesi dopo alla dose di cmc. 1,5, uccise in meno di tre giorni una capra di 38 kgr.
20 VI 5 cmc. di coltura in brodo di bacillo *A*.
10 VII Una cultura di carbonchio *A* su agar in provetta.

28 VII 95. Due culture di carbonchio *A* su agar in provette.
9 VIII 4 culture di carbonchio *A* su agar in provette.
26 VIII 6 culture di carbonchio *A* su agar in provette.
10 IX Salasso dalla giugulare.
5 X 2 culture di carbonchio *A* su agar in capsule di Petri.
7 XI 20 cmc. di cultura in brodo di carbonchio *A*.
26 XI 30 cmc. della cultura precedente.
29 XII 50 cmc. della cultura precedente.
4 I 96. Salasso della giugulare.
9 III Iniettto nel peritoneo 35 cmc. di cultura in brodo in cui ho sospeso 7 culture su agar in provette di bacillo *A*.
19 III Salasso dalla giugulare.

Pecora N. 2, peso kgr. 34.

7 XI 95. 1° vaccino.
19 XI 2° vaccino.
7 XII 1 cmc. di 2° vaccino.
27 XII 1 cmc. di cultura in brodo di bacillo *A*.
9 I 96. 2 cmc. della stessa cultura.
18 I 8 cmc. della stessa cultura.
29 I Salasso dalla giugulare e subito dopo inietto 5 cmc. di cultura in brodo di bacillo *A*.
30 I La pecora partorisce al mattino.
15 II 10 cmc. di cultura in brodo, in cui sospendo 2 culture su agar in provetta di bacillo *A*.
1 III Salasso dalla giugulare.
22 III 100 cmc. nel peritoneo di cultura in brodo di bacillo *A*.
20 IV Inietto sottocute, diluito in brodo, tutto il sangue raccolto dal cuore di coniglio morto di carbonchio *B*. C'è viva reazione locale.
10 V Salasso dalla giugulare.

Capra N. I, peso kgr. 27.

20 XI 95. 1° vaccino, discreta reazione locale.
1 XII 2° vaccino.
12 XII 1 cmc. di 2° vaccino.
27 XII 1 cmc. di cultura in brodo di bacillo *A*.
9 I 96. 2 cmc. della stessa cultura.
14 I Salasso dalla giugulare.
18 I 4 cmc. di cultura in brodo di bacillo *A*.
28 I Salasso dalla giugulare.
14 I 15 cmc. di cultura in brodo di bacillo *A*.
10 II 6 cmc. di coltura in brodo, in cui ho sospeso due culture su agar in provette di bacillo *A*.

16 II 96.	Salasso dalla giugulare.
4 III	6 cmc. di cultura in brodo, in cui ho sospeso 4 culture su agar in provette di bacillo *A*.
22 III	75 cmc. nel peritoneo di cultura in brodo di bacillo *A*.
19 IV	Inietto sottocute tutto il sangue che ho potuto raccogliere dal cuore di un coniglio morto di carbonchio *B*.
3 V	Salasso dalla giugulare.

Capra N. 2, peso kgr. 24.

20 XI 95.	1° vaccino. Forte reazione locale.
1 XII	2° vaccino.
12 XII	1 cmc. di 2° vaccino.
27 XII	6 cmc. di cultura in brobo di bacillo *A*.
11 I 96.	2 cmc. di cultura in brodo di bacillo *A*.
20 I	Salasso dalla giugulare e subito dopo 8 cmc. di cultura in brodo di bacillo *A*.
29 I	15 cmc. di cultura in brodo di bacillo *A*.
9 II	10 cmc. di cultura in brodo, in cui ho sospeso 4 culture su agar in provette di bacillo *A*.
12 III	100 cmc. nel peritoneo di cultura in brodo di bacillo *A*.
30 III	Salasso dalla giugulare.

***

Al fine di vedere come erasi conservata la virulenza del bacillo del carbonchio *B* rimasto a lungo nei tessuti degli animali immunizzati, iniettai ad una cavia (gr. 310) e ad un coniglio (gr. 1350) 1 cmc. di pus aspirato il giorno 16 VII da uno dei due ascessi dell'asino, formatisi in conseguenza dell'iniezione di 7 giorni prima.

Questo pus era ancora molto ricco in bacilli perchè dalle culture in agar, fatte con un'ansa del contenuto di 2 mgr. circa, si sviluppò un centinaio di colonie.

La cavia morì di carbonchio dopo 71 ora ed il coniglio fu trovato morto dopo 12 giorni; senza però che nei suoi organi si sieno trovati bacilli nè all'esame microscopico nè con le prove culturali.

Parmi si possa conchiudere che il bacillo del carbonchio inoculato con il pus trovavasi in istato di attenuazione.

Vero è che col pus sono state iniettate sostanze dotate di quell'azione preventiva, che si riscontrava nel siero di sangue dell'asino; ma deve pure considerarsi che la quantità di bacilli inoculata fu notevole e tale che avrebbe certamente e prontamente ucciso il

coniglio se si fosse trattato di germe *B* non attenuato, nè avrebbe un solo cmc. di siero di asina ritardato che di pochissimi giorni la morte per carbonchio di quel coniglio.

Era ancora da vedersi come si comportava la virulenza del bacillo isolato dal pus e trasportato sugli ordinari mezzi nutritivi, ed ho perciò istituito le seguenti prove:

TAVOLA N. 3.

ANIMALE	PESO	Data della iniezione	QUANTITÀ di cultura iniettata		ORE di vita del coniglio dopo l'iniezione
	Gr.				
Coniglio N. 1	1420	Ore 10 del 18 VII 96	1 cmc.	di cultura del germe *B*	meno di 18 ore
» » 2	1450		1/2 »		meno di 18 ore
» » 3	1450		1 »	di cultura del germe *B* ricavato dall'ascesso	ore 27,30
» » 4	1460		1/2 »		più di 38 ore e meno di 44

Nel secondo ascesso dell'asino, aperto il 19 VII, trovai ugualmente in cultura pura il bacillo del carbonchio, di cui ho determinato il potere patogeno nella seguente serie di esperienze:

TAVOLA N. 4.

ANIMALE	PESO	Data della iniezione	QUANTITÀ di cultura in brodo di 24 ore iniettata		ORE di vita dell'animale dopo l'iniezione
	Gr.				
Coniglio. . . .	1300	Ore 18 del 21 VII 96	1/2 cmc.	di cultura del germe *C*	24
»	1300		1/4 »		28
»	1280		1/2 »	di cultura del germe *C* ricavato dall'ascesso aperto il 19 VII	26
»	1220		1/4 »		30
»	1380		1 »		26
»	1280		1/2 »		47
»	1280		1/4 »		30

Risulta dunque che il bacillo del carbonchio soggiornando nell'organismo di un animale attivamente immunizzato vi subì un lieve grado di attenuazione, che si trasmise nelle culture successive.

***

Per la determinazione del potere preservativo del siero mi sono servito specialmente del coniglio, più di rado della cavia.

Di regola fu da me adoperata la dose di 1 cmc. di cultura in brodo di 24 ore tenuta a 34°-36°.

Iniettai sempre il siero sotto cute al dorso ed il germe all'addome.

Le prove comparative fatte con i diversi sieri e con la cultura *A* misero in evidenza la maggiore attività del siero dell'asino.

Già alla dose di 1 cmc. tale siero, ottenuto al secondo salasso, salvò i conigli del peso di circa 1500 grammi; non si ebbe in essi al punto di innesto che una debolissima reazione locale, la quale mancò quando si impiegò una doppia quantità di siero.

Soltanto il siero di montone alla dose di 2 cmc. valse pure a risparmiare al coniglio la morte, come già riferii nella mia prima comunicazione dell'ottobre scorso; ma un tale esito favorevole non si verificò allora che due sole volte ed anzi non mi fu più dato di riaverlo, neanche con il siero dei salassi fatti dopo allo stesso animale.

Meno attivo del siero di montone fu quello delle due pecore; cosicchè vale per il carbonchio quanto fu riconosciuto vero per la difterite e per il tetano, che cioè il grado di efficacia dei sieri dipende oltrechè dalle specie anche dagli individui immunizzati di una medesima specie.

Le capre sebbene abbiano mostrato, almeno alle prime iniezioni, una maggiore sensibilità al carbonchio che non le pecore, non hanno fornito un siero migliore di queste.

Quando invece del germe *A* feci uso del germe *B* straordinariamente virulento e capace talora di uccidere, come già dissi, alla dose di 1 cmc. di cultura in brodo di 24 ore un coniglio di 1500 grammi circa in meno di 18 ore, il siero più forte da me preparato, cioè quello di asino (2° salasso), si limitò quasi sempre a ritardare di 6-7 e più giorni la morte dei conigli, cui venne somministrato nella quantità di 5-10 cm.

Un solo coniglio su quindici, che furono oggetto d'esperimento, trionfò dell' infezione mediante 7 cmc. di siero iniettato in due volte (5 + 2). Ritengo però che una parte degli insuccessi sia dovuta alle diverse malattie, di cui erano affetti i conigli, in molti dei quali ho riscontrati numerosi cisticerchi nel peritoneo ed estese alterazioni nel fegato e nell'intestino, dovute a psorospermi.

***

La pecora N. 2 mi offerse l'occasione di constatare il passaggio delle sostanze protettive dalla madre al feto.

Il giorno 29 I essa ricevette per la settima volta un'iniezione di carbonchio ed il mattino seguente partorì un agnello bene sviluppato, cui praticai subito un salasso dalla giugulare.

Misi a confronto il siero dell' agnello con quello di una pecora adulta e non immunizzata, istituendo le seguenti prove.

ANIMALE	Peso in grammi	Siero iniettato	Quanto sopravisse il coniglio alle iniezioni di 1 cmc. di cultura in brodo di 24 ore di carbonchio *A*
Coniglio N. 1	1100	10 cmc. di siero di agnellino	12 giorni
» » 2	1070	10 cmc. di siero di pecora non immunizzata	meno di 3 giorni
» » 3	1200	—	2 giorni

Il coniglio N. 1 fu diarroico per tutto il tempo dell'esperimento e all' autopsia riuscì negativa la ricerca dei bacilli nel sangue, mentre si riscontrò una grave coccidiosi del fegato e dell'intestino.

***

Nella mia prima memoria dell'ottobre scorso io non feci cenno del valore preventivo del siero contro il carbonchio delle cavie.

Ad onta di parecchi tentativi non mi era in quel tempo riuscito di combattere con vantaggio l'infezione in questi animali, solo in qualche caso avevo potuto ritardare la morte di poco.

Agli stessi risultati venne Marchoux portando il siero, alla dose anche di 10 cmc., sia sotto cute che nel peritoneo.

Allorchè con i salassi dell'asino ebbi a disposizione mia un siero di efficacia notevole, ritentai le prove sulle cavie e questa volta con migliori risultati.

Edotto dall'esperienza fatta sui conigli, decisi di servirmi di un germe, il cui potere patogeno fosse soltanto mediocre e bene determinato, e diedi la preferenza al primo vaccino di Pasteur.

Di regola 1 cmc. di cultura in brodo di 24 ore di tale vaccino, iniettato sotto cute, uccide la cavia di 300-350 grammi in 45-55-60 ore.

Se l'iniezione si fa invece nel peritoneo, la morte interviene più tardi, quasi sempre in 3ª-4ª giornata, alle volte soltanto in 5ª.

Ho potuto verificare questo ritardo anche con un altro bacillo leggermente più attenuato del 1° vaccino.

Iniettando 1 cmc. di cultura in brodo di 24 ore di primo vaccino o nel tessuto sottocutaneo o nel peritoneo di cavie presso a poco dello stesso peso (gr. 300-350), già il giorno dopo si assiste nelle prime allo sviluppo di un edema sottocutaneo, che va assumendo in seguito dimensioni enormi. Se l'iniezione nel peritoneo è riuscita in modo conveniente, cioè senza che sia rimasto un numero troppo grande di germi sotto cute portativi dall'ago della siringa, l'animale non presenta in 1ª ed in 2ª giornata reazione di sorta al punto di innesto. Più tardi però quivi compare un po' di tumefazione, che va man mano estendendosi.

D'ordinario quanto più presto si manifesta l'edema sottocutaneo tanto prima muore l'animale.

La cavia dunque meglio si difende dal germe del carbonchio *attenuato* messo nel peritoneo che non portato sotto pelle.

Lo stesso fatto, del resto, si ripete per altri germi.

Secondo Roux e Yersin l'inoculazione del bacillo della difterite nel peritoneo fa soccombere le cavie meno rapidamente dell'iniezione sottocutanea

Il peritoneo dei conigli (Grawitz, Steinhaus, Hermann) sopporta dosi di cultura di stafilococco piogene aureo molto più forti, che non altri organi, senza suppurare.

Dal libro di laboratorio riporto una serie di esperimenti in cui il siero di asina del secondo salasso tenne in vita le cavie infettate nel peritoneo di 1° vaccino.

Esperienza I.

6 VIII 96. Cavie due. Peso gr. 350.
Ciascuna riceve nel peritoneo, alle ore 10, 1 cmc. di cultura in brodo di 24 ore di 1° vaccino.
8 VIII Una cavia presenta un po' di edema al punto di innesto.
9 VIII Muore alle ore 17 la cavia che presentò edema.
Compare un po' di reazione al punto d'innesto nell'altra cavia.
10 VIII È cresciuto l'edema.
11 VIII Trovata morta la seconda cavia.

Esperienza II.

6 VIII 96. Cavie due. Peso gr. 340.
Ciascuna riceve, alle ore 10, nel peritoneo, 1 cmc. di cultura in brodo di 24 ore di 1° vaccino e subito dopo, sotto cute al dorso, 5 cmc. di siero di asino (salasso del 24 VII 96).
30 VIII Le cavie non presentarono mai disturbi di sorta e raggiungono oggi il peso di gr. 370.

Esperienza III.

6 VIII 96. Cavie due. Peso gr. 335.
Ciascuna riceve nel peritoneo, alle ore 10, 1 cmc. di cultura in brodo di 24 ore di 1° vaccino e subito dopo, al dorso, 1 cmc. di siero di asina (salasso del 24 VII 96).
8 VIII Iniettto al dorso 1 cmc. di siero di asino (salasso del 24 VII 96).
11 VIII Inietto al dorso 1 cmc. di siero di asino (salasso del 1 VII 96).
13 VIII Inietto al dorso 1 cmc. di siero di asino (salasso del 1 VII 96).
8 IX Le due cavie sono ancora oggi vive e pesano gr. 355 e 420.

A dimostrazione del potere del siero contro l'inoculazione sottocutanea del carbonchio, valga la seguente serie di esperienze tanto più probativa in quanto che qui fu adoperato soltanto il siero di asino del salasso del 1° luglio, mostratosi nei conigli meno attivo di quello del 2° salasso.

Esperienza I.

11 VIII 96. Cavie due. Ciascuna pesa gr. 300.
Alle ore 18 ciascuna riceve sotto cute all'addome $1/2$ cmc. di cultura in brodo di 24 ore di 1° vaccino.
14 VIII Trovate morte al mattino.

Esperienza II.

11 VIII 96. Cavia di gr. 330. Alle ore 18 riceve sotto cute all' addome $1/2$ cmc. di cultura in brodo di 24 ore di 1° vaccino e $1/2$ ora dopo al dorso 5 cmc. di siero d'asino.

13 VIII 96. C'è un po' di infiltrazione al luogo di innesto della cultura. Inietto 1 cmc. di siero al dorso.
15 VIII L'infiltrazione non si è estesa. Inietto 1 cmc. di siero al dorso.
17 VIII L'essudato sottocutaneo è duro e un po' più esteso. Il peso è ridotto a gr. 265. Inietto 1 cmc. di siero al dorso.
8 IX La cavia si è perfettamente rimessa, è vispa e pesa gr. 315.

Esperienza III.

11 VIII 96. Cavia di gr. 320. Alle ore 18 riceve sottò cute all'addome $^1/_2$ cmc. di cultura in brodo di 24 ore di 1° vaccino e $^1/_2$ ora dopo al dorso 5 cmc. di siero di asino.
17 VIII Già al 2° giorno scomparve ogni reazione locale, la cavia però andò dimagrando ed oggi pesa gr. 290.
27 VIII Trovo morta la cavia. Il peso è di gr. 320.
Spiccata degenerazione grassa del fegato.
Milza di poco ingrandita con due noduli da pseudo tubercolosi. Quantità enorme di bacilli del carbonchio nel sangue.

Esperienza IV.

11 VIII 96. Cavia di gr. 340. Alle ore 18 riceve $^1/_2$ cmc. di cultura in brodo di 24 ore di 1° vaccino sotto cute all'addome, e $^1/_2$ ora dopo 2 cmc. di siero al dorso.
13 VIII inietto 1 cmc. di siero al dorso.
15 VIII Idem.
17 VIII Peso ridotto a gr. 280.
21 VIII Trovo morta di carbonchio la cavia. Peso gr. 300.
Reperto ordinario.

Esperienza V.

11 VIII 96. Cavia di gr. 350. Alle ore 18 riceve $^1/_2$ cmc. di cultura in brodo di 24 ore di 1° vaccino sotto cute all'addome e $^1/_2$ ora dopo 2 cmc. di siero al dorso.
13 VIII Lieve infiltrazione al luogo d'innesto.
17 VIII Persiste l'infiltrazione e si è fatta più consistente. Inietto 1 cmc. di siero al dorso.
8 IX La cavia sta perfettamente bene e pesa gr. 440.

Desiderando vedere se in seguito alle iniezioni del carbonchio e del siero avevano le cavie acquistato una certa durevole immunità, ho nuovamente introdotto nel peritoneo, il giorno 30 VIII 96, 1 cmc. di 1° vaccino alle due cavie, che avevano servito per la 2ª esperienza del giorno 6 VIII 96. Esse stanno oggidì (10 IX)

benissimo e pesano gr. 390 l'una e grammi 400 l'altra, mentre una cavia di controllo morì in 3ª giornata.

Raggiunto così un primo grado di resistenza, si potrà forse procedere oltre nel trattamento della cavia, che, per esperienza di molti, si lascia immunizzare con estrema difficoltà, e soccombe specialmente alle prime dosi di carbonchio.

***

Era mia intenzione di ripetere queste esperienze con un germe più attivo del 1° vaccino, moderandone la virulenza mediante la introduzione di esso nella cavità peritoneale; ma con mia sorpresa mi accorsi ben tosto che le culture *B* e *C* non si comportavano come quelle attenuate, riuscendo esse ordinariamente più micidiali per la cavia se iniettate nel peritoneo anzichè sotto cute.

Molte esperienze mi resero persuaso di questo fatto, che parevami a tutta prima paradossale; mi limito a presentare quelle, in cui la comparazione dei risultati riesce più significativa, perchè fatte con cavie di peso quasi uguale e per le quali potei con tutta esattezza determinare il momento del decesso.

ANIMALE	PESO	Quantità di cultura iniettata	Luogo dove fu iniettata la cultura	Ore di vita dopo l'iniezione
Cavia N. 1	gr. 340	1 cmc. di cultura in brodo di 24 ore del germe *B*.	sotto cute	24,30
» » 2	» 340	id.	id.	27,15
» » 3	» 330	id.	id.	26,15
» » 4	» 350	id.	peritoneo	18,30
» » 5	» 350	id.	id.	29,30
» » 6	» 340	id.	id.	19,30
» » 7	» 330	id.	sotto cute	27,30
» » 8	» 330	id.	id.	27,30
» » 9	» 330	id.	peritoneo	22,30
» » 10	» 330	id.	id.	27
» » 11	» 330	1 cmc. di emulsione in brodo di spore del bacillo *B*.	sotto cute	31
» » 12	« 330		peritoneo	22

Alla sezione delle cavie uccise con carbonchio molto virulento, iniettato nel peritoneo, si trova in questa cavità il solito reperto che si ha per le cavie morte in conseguenza delle iniezioni sottocutanee. Ben di spesso però vi si riscontra in più una discreta quantità di liquido sieroso, o sieroso sanguinolento, ma ciò che non manca mai in questi animali è un versamento nella cavità toracica, quasi sempre abbondantissimo. Tale essudato limpido o tinto leggermente in rosso, è povero in corpuscoli bianchi, ricchissimo alle volte invece in bacteri.

Se la morte ritarda al di là delle 30-36 ore di solito più non si riscontra l'essudato pleurico, il quale manca costantemente nei casi in cui l'animale ha vissuto più a lungo.

***

Queste differenze riscontrate all'autopsia delle cavie, che hanno ricevuto nel peritoneo culture di carbonchio in vario stato di virulenza, mi condussero a studiare come nei diversi casi procedesse l'infezione, sottoponendo di quando in quando ad esame il contenuto peritoneale ed il tessuto sottocutaneo delle cavie inoculate.

Per estrarre il liquido dal peritoneo ricorsi alla ordinaria tecnica ben nota, cioè all'uso di tubetti di vetro affilati ad un capo. Con questa parte sottile e capillare attraversavo le parti addominali, previa ferita della pelle con un punteruolo. Il liquido salito per capillarità era soffiato fuori su vetrini coprioggetti.

La colorazione del preparato fu fatta sempre con la soluzione acquosa diluita di bleu di metilene.

Tutte le esperienze furono istituite su cavie del peso di gr. 300-350.

All'introduzione nel peritoneo di 1 cmc. di cultura in brodo di 1° vaccino di 24 ore circa, tiene dietro una pronta ed estesa fagocitosi. Già dopo 2-5 minuti primi alcuni dei leucociti del liquido peritoneale sono infarciti di bacilli. Ad un esame ulteriore fatto dopo $^1/_2$ ora-1 ora si nota già un aumento dei leucociti polinucleati, meno numerosi si scorgono i corpuscoli bianchi contenenti bacteri, e c'è sempre un numero più o meno rilevante di bacilli liberi.

Se l'esame si pratica più tardi vanno sempre mano mano aumentando i leucociti polinucleati, appaiono sempre più rari i leu-

cociti contenenti bacteri, ed i bacilli liberi subiscono profonde modificazioni nell'aspetto, nella grandezza e nella colorabilità.

I bacilli si fanno notevolmente più grandi; molti si circondano di una capsula, la quale si tinge leggermente in violaceo con il bleu di metilene, mentre il bacillo si colora in azzurro cupo.

Alcuni bacilli si vanno facendo granulosi, diventano grossi agli estremi, stando uniti in filamenti; in altri compaiono numerosi punti chiari non tingibili. Si vedono inoltre forme estremamente pallide, appena discernibili nel campo del microscopio. In alcuni casi il bacterio è rappresentato da un grosso elemento bastonciniforme colorito in viola pallido, percorso nella sua parte assiale da un filo sottile tinto nettamente in bleu.

Ci troviamo qui in presenza di quelle forme degenerative descritte da tutti gli autori, che studiarono la distruzione dei bacilli del carbonchio nel corpo degli animali refrattari. Faccio notare che allorchè i bacilli del carbonchio si presentano in questi stati di alterazione, non si compie più su di essi il fenomeno della fagocitosi.

Dalla osservazione del modo come si seguono i fatti sovraesposti si acquista la convinzione che le capsule, di cui ben presto si riveste buon numero dei bacteri liberi, rappresentano un apparecchio di protezione, il quale però, nel caso nostro, non riesce ad impedire la ulteriore dissoluzione del germe.

Che tale sia l'ufficio delle capsule dei bacteri è ritenuto da altri, p. es. da Metchnikoff (1), il quale vede un organo di difesa nello involucro, che chiude il bacillo della tubercolosi dentro le cellule giganti del Meriones Shawi.

Babes (2) dice « che l'elaborazione delle capsule costituisce un « atto di difesa da parte dei bacteri, che esse sono cioè incari- « cate delle funzioni di un apparecchio conservatore della specie ».

La scomparsa dei bacteri dal peritoneo non avviene con eguale rapidità nelle diverse cavie di peso uguale, ma di solito in capo a 8-9 ore il microscopio non svela più che la presenza di numerosi leucociti.

---

(1) METCHNIKOFF: « La patologie comparée de l'inflammation », pag. 197.

(2) BABES: « Observations sur les corpuscoles metachromatiques, les spores, les ramifications et les capsules des bactéries pathogènes ». *Annales de l'Institut de pathologie et de bactériologie de Bucarest*, 1895, pag. 402.

Che cosa succede più tardi dei germi introdotti nel peritoneo?

Sono i bacilli, inglobati dai leucociti, trasportati in qualche organo per svilupparsi più tardi?

Può l'esame culturale svelare ancora nell'essudato peritonale la presenza di batteri quando è negativa la ricerca microscopica?

Alcune osservazioni e prove da me fatte mi permettono di rispondere in parte a queste domande.

Ho iniettato la solita quantità di 1° vaccino nel peritoneo ad alcune cavie e le ho sacrificate poscia l'una dopo l'altra. Con il materiale raccolto da diversi organi ho infettato l'acqua di condensazione di alcuni tubi di agar, facendo poi scorrere il liquido sul mezzo nutritivo.

Dal peritoneo presi sempre 2 grosse anse di essudato (ansa di 2 mm. circa di diametro) per ogni provetta; con altra piccola ansa di circa $^1/_2$ mm. di diametro penetrai nel parenchima del fegato e della milza e nella cavità del cuore, dopo avere causticato la superficie di questi organi; mi servii dell'ago diritto per asportare un po' di midollo dalla cavità del femore tagliato con forbici roventi.

	CAVIA N. 1 uccisa 7 ore dopo l'innesto	CAVIA N. 2 ucc. 23 ore dopo l'innesto	CAVIA N. 3 ucc. 33 ore dopo l'innesto
Peritoneo	1 colonia	1 colonia	—
Milza	2 colonie	—	7 colonie
Fegato	— (1)	—	2 colonie
Cuore	—	—	1 colonia
Midollo	—	—	—

Dal peritoneo di due altre cavie, uccise 8-9 ore dopo l'innesto, non ottenni sviluppo di nessun germe.

È mia intenzione continuare queste indagini sulla sorte che attende i germi iniettati nel peritoneo. Mi credo però autorizzato

(1) Risultato della cultura negativo.

fin d'ora a ritenere che un numero grandissimo dei bacilli di 1° vaccino, sia che essi vengano inglobati subito dai leucociti o rimangano liberi nel plasma, è destinato a morire, e che ad un certo momento diventa amicrobico il peritoneo, il quale è stato il teatro delle prima battaglia, che l'organismo animale ha impegnato con i bacteri.

La condizione che i germi del 1° vaccino trovano nel tessuto sottocutaneo delle cavie è ben diversa da quella offerta loro dal peritoneo. Là è più difficile l'accorrere dei leucociti i quali si incarichino di inglobare i bacteri e di cedere forse al plasma delle sostanze bactericide.

Con l'esame di un po' di liquido estratto con i tubetti di vetro dal luogo di innesto mi avvidi infatti che la fagocitosi si compie sotto cute scarsamente anche in principio, e i germi cominciano assai presto a moltiplicarsi in sito.

Poche sono le forme degenerate dei bacteri mentre si trovano anche qui dopo un po' di tempo (6 o 7 ore circa) bacilli con capsula ben evidente.

Tuttociò spiega l'evoluzione più breve della malattia quando il 1° vaccino viene introdotto sotto cute anzichè nel peritoneo.

Quando per l'iniezione peritoneale ricorsi al bacillo *B* molto virulento, riscontrai in principio quanto ho già descritto a proposito del 1° vaccino.

Dopo 2-5-10 minuti si trovano numerosi bacilli inglobati. Ma le forme, che dopo $^1/_2$-1 ora sono rimaste libere nel plasma, acquistano dimensioni maggiori, si circondano quasi sempre di capsula, ed entrano ben presto in scissione. Il numero dei bacteri va man mano crescendo fino alla morte dell'animale. Non molto frequentemente si trovano in principio forme degenerate.

Scarsi si mantengono i leucociti nell'essudato.

Qui dunque l'organismo della cavia non riesce a contrastare che debolmente la vittoria dei parassiti, tutto si limita da parte sua all'inglobamento di alcuni bacteri al loro primo arrivo nel peritoneo e ad ottenere la degenerazione di qualche forma bacillare.

Nel plasma peritoneale, libero quasi dei leucociti e dei prodotti della vita di questi, i bacilli trovano un ambiente favorevole per crescere rigogliosamente, meglio assai che non sotto cute; donde la spiegazione del più rapido decesso.

***

Abbiamo visto che iniettando nel peritoneo delle cavie culture di carbonchio, sieno queste di germi mediocremente attenuati o virulentissimi, succede sempre che all'iniezione peritoneale tien dietro immediatamente una spiccata fagocitosi, che ad un dato momento finisce per arrestarsi.

La ragione della preferenza data dai leucociti ad alcuni germi soltanto, sarebbe da ricercarsi, secondo le vedute della scuola di Metchnikoff, nella minore resistenza organica degli elementi inglobati.

Noi sappiamo che la durata della vita dei bacteri, coltivati sugli ordinari mezzi nutritivi, è ben diversa da individuo a individuo, e per alcuni brevissima.

Ciò fu specialmente determinato con esattezza da Gotschlich e Weigang per il colera (1).

In una delle varie esperienze all'uopo istituite, essi trovarono che il numero dei germi di una cultura in agar era ridotto dopo 44 ore al 7,43 % e dopo 68 ore al 0,80 % del numero riscontrato nella cultura dopo 20 ore dall'insemenzamento.

Accanto a forme rigogliose e vivaci nelle culture se ne trovano dunque altre morte o debilitate, ed è su queste che la fagocitosi devesi specialmente esercitare.

Per procurarmi bacilli vigorosi e provati alla lotta con i leucociti, aspirai con una siringa il sangue o l'essudato pleurico delle cavie morte di carbonchio, e iniettai nel peritoneo di altre cavie questi liquidi o le diluzioni di essi in brodo di Loeffler.

Ma alla introduzione di questo materiale virulento non tiene dietro fagocitosi di sorta.

Se però si inietta nel peritoneo sangue di cavia uccisa dal 1° vaccino, va man mano crescendo il numero dei leucociti e un buon numero di bacilli comincia a degenerare.

Restano però sempre nel plasma molte forme libere che a un dato momento entrano in scissione, rivestendosi alcune di capsula.

---

(1) GOTSCHLICH und WEIGANG: « Ueber die Beziehungen zwischen Virulenz und Individualzahl einer Cholera-cultur ». *Zeitschrift für Hygiene*, vol. 20, pag. 376.

Dopo 5-6 ore dall' innesto mi occorse in qualche raro caso di vedere alcuni bacilli, che mi parevano inglobati dai leucociti, ma non potrei escludere assolutamente il dubbio che si trattasse di bacilli applicati all' esterno dell' elemento cellulare.

Più prontamente avviene nel peritoneo la moltiplicazione dei germi provenienti dal sangue o dall' essudato pleurico di cavie inoculate di bacillo virulentissimo.

Scarsissimo è in tali casi il numero dei leucociti e quello delle forme degenerate.

Questi esperimenti non escludevano però che la fagocitosi fosse impedita da una qualche sostanza disciolta nel sangue o nell' essudato pleurico, elaborata dai bacteri, e capace di paralizzare i leucociti.

Tale ipotesi però non regge perchè se al sangue e all'essudato pleurico di cavie morte di carbonchio si aggiunge un po' di cultura in agar di bacilli carbonchiosi, poco o molto virulenti, si esercita su buona parte di questi la fagocitosi come se la cultura fosse stata da sola iniettata nel peritoneo.

È facile distinguere nei preparati i bacilli di cultura dagli altri, perchè più piccoli e tinti di un azzuro più pallido.

Il riconoscimento loro è ancora più agevole se si adoperano culture vecchie di qualche giorno dove predominano le forme con spazi chiari nell' interno non colorabili con il bleu di metilene.

***

Già ho detto che il peritoneo delle cavie, iniettate con culture di 1° vaccino, ad un certo momento si presenta amicrobico, ed ho messo in rapporto questo fatto con il decorso più lento che assume la malattia che non quando si porta il germe sotto cute.

Ma la scomparsa dei bacteri dal peritoneo non si ottiene se in esso si introducono bacilli di 1° vaccino provenienti dal sangue di una cavia, che soggiacque all'infezione. Era dunque logico sospettare che con tale sangue si sarebbe potuto uccidere, per lo meno in egual tempo, le cavie, infettandole nel peritoneo o sotto cute.

Queste sei prove confermarono la ipotesi. Un cmc. di sangue di cavia, inoculata di 1° vaccino e morta da pochi minuti, venne diluito in 10 cmc. di brodo.

A ciascuna delle 6 cavie fu inoculato 1 cmc. della diluzione.

ANIMALE	PESO	Località dove fu introdotta la diluzione	Quante ore visse la cavia dopo l'iniezione
Cavia . . . . N. 1	gr. 350	peritoneo	26
» . . . . . » 2	» 330	id.	37
» . . . . . » 3	» 320	id.	31
» . . . . . » 4	» 350	sotto cute	+ di 40 e — di 46
» . . . . . » 5	» 330	id.	37
» . . . . . » 6	» 330	id.	49

***

L'esito mortale delle cavie infettate col 1° vaccino può essere scongiurato, come già riferii, dalla somministrazione del siero di asina immunizzata, e con lo stesso mezzo può essere protratta la vita di quelle altre cavie, che hanno ricevuto un germe straordinariamente attivo.

Premevami naturalmente vedere come il siero modificasse il processo fagocitario, dalle variazioni del quale specialmente dipende, come si è visto, il diverso andamento dell'infezione carbonchiosa.

Come riassunto delle osservazioni fatte posso dire che nelle cavie, inoculate nel peritoneo di 1° vaccino ed alle quali fu iniettato il siero sotto cute, la distruzione si compie come quando non fu somministrato il siero. Forse è maggiore il numero dei bacteri inglobati e più rapida la scomparsa dei germi dal peritoneo.

Molto manifesta invece è l'azione del siero se non sul solo processo fagocitario, su quello di distruzione dei germi, nelle cavie infettate nel peritoneo con un bacterio molto virulento.

Valga per dimostrazione questa esperienza:

8 VIII 96. *Ore 16,30.* Inoculo sotto cute al dorso ad una cavia *A*, del peso di gr. 340, 5 cmc. di siero di asino (salasso del 1° VII 96).

9 VIII 96. *Ore 7,30.* Inietto nuovamente al dorso altri 5 cmc. dello stesso siero.

Ore 9,45. Inietto nel peritoneo alla cavia *A* e ad un' altra cavia *B* (peso gr. 360) 1 cmc. di cultura in brodo di 24 ore del germe virulentissimo *B*.

Ore 10,10. Nei liquidi peritoneali delle due cavie ci sono molti bacilli inglobati dai leucociti. La fagocitosi è più spiccata nei preparati della cavia *A*.

Ore 11,15. Diminuiti in numero i leucociti contenenti bacilli. I bacilli liberi sono più numerosi nei preparati fatti dalla cavia *B*.

Ore 15,30. Cavia *A:* Ci sono molti leucociti prevalentemente polinucleati e pochi bacilli uniti in filamenti (1 filamento ogni 2–3 campi), pallidi, granulosi, ingrossati tratto tratto a canna di bambù.

Cavia *B:* È aumentato il numero dei bacilli liberi, non si vedono bacilli inglobati.

I bacilli liberi hanno capsula ben evidente, tinta leggermente in violaceo dal bleu di metilene. Di poco aumentato il numero dei leucociti.

Ore 19. Reperto come alle ore 15,30 per le due cavie *A* e *B*.

10 VIII *Ore 7.* Trovo morta la cavia *B*. All'autopsia c'è scarso essudato peritoneale, abbondante essudato sieroso sanguinolento nella cavità toracica. Discreta quantità di bacilli nell'essudato pleurico, assai più numerosi i bacilli nell'essudato peritoneale e nel sangue.

Nel peritoneo della cavia *A* ci sono molti leucociti, ma non si scorgono bacilli.

11 VIII Trovo morta al mattino la cavia *A*. Manca il versamento nella cavità toracica. Ci sono molti bacilli nel sangue e pochi nello scarso essudato peritoneale.

Ma l'efficacia del siero nel determinare la fagocitosi si ha specialmente modo di constatarla in quelle cavie, cui venga iniettato nel peritoneo una diluzione di sangue di altre cavie morte di 1° vaccino.

24 VIII 96. *Ore 17.* Cavia *A* di gr. 330. Cavia *B* di gr. 350. A ciascuna inietto al dorso 5 cmc. di siero di asino immunizzato (salasso del 1° VII 96).

25 VIII *Ore 7.* Inietto a ciascuna cavia al dorso altri 4 cmc. dello stesso siero.

25 VIII 96. *Ore 7,45.* Inietto nel peritoneo alle due cavie *A* e *B* e ad una terza cavia di controllo *C* (peso gr. 370), 1 cmc. di una diluzione fatta con 5 cmc. di brodo ed 1 cmc. di sangue preso da una cavia morta da poco in seguito ad inoculazione di 1° vaccino.

Ore 7,55. Esamino il peritoneo delle cavie *A* e *C*. Uguale reperto, cioè bacilli tutti liberi.

Ore 8,15. Idem.

Ore 11. Cavia *A*. Bacilli tutti liberi, di cui molti sono pallidi e granulosi.

Cavia *C*. Bacilli tutti liberi, più numerosi che nella cavia *A*. Poche le forme degenerate. Bacilli quasi tutti capsulati.

Ore 17. Cavia *A*, moltissimi leucociti, alcuni dei quali contengono 4 o 5 bacilli.

I bacilli liberi sono in minor numero di prima e quasi tutti degenerati.

Cavia *C*. Scarsi leucociti. Molti bacilli tutti liberi, pochi i generati.

26 VIII *Ore 7.* Trovo morta la cavia *C*. All'autopsia c'è il solito essudato pleurico.

Ore 8. Non essendo riuscito ad avere liquido dal peritoneo con i tubi capillari di vetro, uccido la cavia *A* ed esamino l'essudato peritoneale.

Rarissimi i bacilli liberi e questi spiccatamente degenerati.

Molti leucociti, alcuni polinucleati, prevalgono però in numero elementi ad un solo nucleo con abbondante protoplasma. Numerosi bacilli inglobati dei quali alcuni di tinta normale, altri granulosi, altri rappresentati solo più da una serie di granuli colorati in rosso dal bleu di metilene.

Ore 16. Esamino per la prima volta il peritoneo della cavia *B*. Ottengo da esso un essudato quasi lattiginoso.

Reperto identico a quello di stamane della cavia *A*.

27 VIII *Ore 10.* Molti leucociti; in minor numero di ieri i bacilli inglobati e questi con l'aspetto allora descritti.

In due preparati ho visto un solo filamento libero di bacilli estremamente pallidi.

28 VIII *Ore 9.* Più rari si son fatti i bacilli inglobati.

29 VIII Muore verso le ore 8 la cavia *B*.

Degenerazione grassa del fegato; non trovo bacilli nell'essudato peritoneale e ce ne sono pochissimi nel sangue.

Dalla comparazione di tutti questi risultati, che si ottengono in virtù del siero anticarbonchioso, si è dunque condotti a stabilire

che tale siero esercita nelle cavie una azione protettiva in quantochè favorisce i due processi di distruzione, di cui si vale normalmente l'organismo di questo animale per ostacolare la invasione del bacillo dell'antrace, eccita cioè la fagocitosi, ed accresce l'azione bactericida degli umori.

***

Nelle culture in brodo del bacillo del carbonchio, tenute non più di 24 ore a svilupparsi in termostato e delle quali specialmente mi servii per le indagini soprariferite, non mi accadde di riscontrare che forme vegetative all'esame microscopico.

Da qualche tempo ho intrapreso a studiare il comportamento delle spore di carbonchio nel peritoneo delle cavie, sottoposte o no all'azione del siero anticarbonchioso. Non sono per ora in grado di formulare leggi sul destino riservato a queste forme durevoli; mi basta rilevare la grandissima rapidità, con cui si modificano le spore di carbonchio, sospese in acqua distillata e iniettate nel peritoneo delle cavie normali, diventando capaci di tingersi facilmente a freddo con il bleu di metilene in soluzione acquosa diluita.

Già dopo due minuti una buona metà delle spore diventa colorabile e dopo 5-10 minuti sono rare le spore che non si tingono.

Tale cambiamento di proprietà preludia al germogliamento che alle volte è completo dopo 3-4 ore.

***

Nel gennaio del 1887 Metchnikoff (1) pubblicò alcune sue ricerche sull'attenuazione del bacillo carbonchioso coltivato nel sangue di montoni immunizzati. Con tali colture iniettate anche in forte quantità in 10 conigli, egli non ebbe la morte che di un solo animale. Riuscirono invece sempre letali le culture fatte in sangue di coniglio, di cavia, di capra e di cane.

Ma col germe del carbonchio si iniettava nella prima esperienza anche siero di montone immunizzato, capace forse di proteggere il coniglio dall'infezione.

---

(1) METCHNIKOFF: « Sur l'atténuation des bacteridies charbonneuses ». *Annales de l'Institut Pasteur*, vol. 1°, pag. 42.

Resta dunque il dubbio che il bacillo avesse conservato tutta la sua virulenza sviluppandosi nel sangue dei montoni immunizzati, pur non essendo la cultura in tale sangue in grado di far perire il coniglio.

Per chiarire la questione distribuii in alcune provette, nella quantità di 5 cmc. per ciascuna, brodo ordinario di Loeffier e siero di asino e di cavallo immunizzati e non immunizzati contro il carbonchio. Infettai diversi tubi con un' ansa di cultura di carbonchio *B* e li tenni, alcuni alla temperatura dell'ambiente (23-25°), altri nel termostato a 34-36°.

Nei sieri di cavallo il germe si sviluppò tanto dentro che fuori della stufa, sebbene più lentamente che nel brodo Crebbe sollecitamente nel siero di asino non immunizzato, meno bene nel siero di asino vaccinato, anzi non attecchì addirittura nelle provette contenenti il siero del salasso del 24 VII e tenute a temperatura ambiente.

Ho notato però che nei diversi sieri il carbonchio pur crescendo con ritardo, finì per assumere uno sviluppo più abbondante che nel brodo.

Non ho mai trovato forme sporali in queste culture in siero di asino e di cavallo, mentre ebbi occasione di vederne moltissime nel siero di montone immunizzato.

In quantità maggiore che in quelli degli altri sieri trovai forme degenerate nei preparati di siero di asino immunizzato.

La determinazione della virulenza fu fatta o introducendo sotto la pelle delle cavie una piccola quantità di cultura presa con un'ansa di platino (del diametro di 1 mm. circa) e sospesa in un cmc. di brodo; oppure iniettando ai conigli 1 cmc. di una cultura di trasporto in brodo di 24 ore.

Nel primo caso si portò veramente nel corpo dell'animale una piccola quantità di siero protettivo, ma non certo tale da modificare l'andamento dell'infezione che il germe virulentissimo *B* è capace di determinare nella cavia, tanto sensibile al carbonchio.

A tre diverse epoche, cioè dopo 17-42-43 giorni dall'innesto, ho saggiato la virulenza di tre culture in brodo di Loeffier, in siero di cavallo immunizzato e in siero di cavallo non immunizzato tenutr alla temperatura dell'ambiente.

Un cmc. di una cultura in brodo di 24 ore, fatta il giorno in cui ho infettato le tre provette e con lo stesso germe adoperato per queste, mi uccise un coniglio di 1280 grammi in 22 ore.

Ecco i risultati:

Dopo 17 giorni

ANIMALE	PESO	I conigli ricevono 1 cmc. di cultura in brodo di 24 ore di trasporto dal	Quante ore visse il coniglio dopo l'innesto
Coniglio	gr. 1450	brodo di Loeffler	+ di 37 e — di 42
»	» 1400	siero di cavallo non immunizzato	36
»	» 1500	siero di cavallo immunizzato	21

Dopo 42 giorni

ANIMALE	PESO	Le cavie ricevono 1 ansa di cultura in	Quante ore visse la cavia dopo l'innesto
Cavia	gr. 280	brodo di Loeffler	32
»	» 280	siero di cavallo non immunizzato	37
»	» 280	siero di cavallo immunizzato	38

Dopo 43 giorni

ANIMALE	PESO	I conigli ricevono 1 cmc. di cultura in brodo di 24 ore di trasporto dal	Quante ore visse il coniglio dopo l'innesto
Coniglio	gr. 1670	brodo di Loeffler	37
»	» 1680	idem	38
»	» 1660	siero di cavallo non immunizzato	39
»	» 1670	idem	48
»	» 1660	siero di cavallo immunizzato	20
»	» 1660	idem	37

Le medesime esperienze furono istituite con quattro culture in brodo di Loeffler, in siero di asino non immunizzato e in due sieri di asino immunizzato (salasso del 1° VII e del 24 VII) conservate nel termostato a 34-36°.

Il bacillo del carbonchio *B*, quando furono infettate le provette, uccise un coniglio di gr. 1600 in 28 ore alla solita dose di 1 cmc. di cultura in brodo di 24 ore.

Dopo 15 giorni			
ANIMALE	PESO	Le cavie ricevono 1 ansa di cultura in	Quante ore visse la cavia dopo l'innesto
Cavia	gr. 270	brodo di Loeffler	31
»	» 280	siero di asino non immunizzato	45
»	» 270	siero di asino immunizzato (salasso del 1° VII)	41

Dopo 35 giorni			
ANIMALE	PESO	Le cavie ricevono 1 ansa di cultura in	Quante ore visse la cavia dopo l'innesto
Cavia	gr. 280	brodo di Loeffler	29
»	» 280	siero di asino non immunizzato	37
»	» 280	siero di asino immunizzato (salasso del 1° VII)	48
»	» 280	siero di asino immunizzato (salasso del 24 VII)	40

Dopo 36 giorni			
ANIMALE	PESO	I conigli ricevono 1 cmc. di cultura in brodo di 24 ore di trasporto dal	Quante ore visse il coniglio dopo l'innesto
Coniglio	gr. 1430	brodo di Loeffler	29
»	» 1530	idem	57
»	» 1400	siero di asino non immunizzato	30
»	» 1500	idem	24
»	» 1450	siero di asino immunizzato (salasso del 1° VII)	30
»	» 1410	idem	30
»	» 1450	siero di asino immunizzato (salasso del 24 VII)	39
»	» 1420	idem	44

Il bacillo del carbonchio dunque rimasto a contatto per 43 giorni con il siero di cavallo immunizzato conservò la virulenza non meno che nel brodo di Loeffler e nel siero di cavallo non immunizzato.

Nel siero di asino fortemente immunizzato invece il bacillo accennò ad attenuarsi, ma in grado leggiero.

Roma, 12 settembre 1896.

ANNO VII — ROMA - 1896 — ANNO VII

RIVISTA
D'IGIENE E SANITÀ PUBBLICA

DIREZIONE
Piazza di Pietra, 40, p. 2°

AMMINISTRAZIONE
Via Federico Cesi, 12

ROMA

CONDIZIONI D'ASSOCIAZIONE.

La *Rivista* si pubblica il 1° ed il 16 di ogni mese.

Il prezzo d'abbonamento annuo è di L. **12**.

Coloro che desiderano avere i 17 numeri pubblicati nel 1890 e quelli usciti nelle annate 1891-92-93-94-95, potranno ottenerli inviando al nostro Amministratore L. **36**.

Lettere, stampe, giornali, corrispondenze dirigansi alla **Redazione** della *Rivista d'igiene e sanità pubblica* – **Piazza di Pietra, N. 40, p° 2° – ROMA.**

I manoscritti non si restituiscono.

Per abbonamenti rivolgersi *esclusivamente* all'Amministratore, **Cav. Ragioniere ALCESTE MARZARI, Via Federico Cesi, 12.**